



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03137621.5

[43] 公开日 2003 年 11 月 26 日

[11] 公开号 CN 1458281A

[22] 申请日 2003.6.18 [21] 申请号 03137621.5
[71] 申请人 天津环球中加生物科技有限公司
地址 300457 天津市经济技术开发区第一大街
晓园东路三号
[72] 发明人 仵小南 吴 和

[74] 专利代理机构 北京金硕果知识产权代理事务
所
代理人 张 玫

权利要求书 2 页 说明书 55 页 附图 2 页

[54] 发明名称 严重急性呼吸道综合症病原冠状病毒
RNA 干扰制剂

[57] 摘要

本发明运用核糖核酸干扰(RNAi)的分子生物学原理,研制了系列严重急性呼吸道综合症病原冠状病毒 RNA 干扰制剂。所述制剂中含有多组与冠状病毒基因物质相对应的长链 RNA 或 DNA(dsRNA or dsDNA), 及小片段 RNA 或 DNA(siRNA or siDNA)。所述 RNA 或 DNA 包括 SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.80(siRNA or siDNA), 以及包括由 SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.116 经多聚酶链式反应和 RNA 体外合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA(dsRNA or dsDNA)。本发明的制剂能够用于 SARS 的诊断、治疗,效果明显,开发周期短,并适合于正常及高危人群预防。

知识产权出版社出版

2004年10

1. SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.80 所示序列的 RNA 或 DNA。

2. 长链 DNA 和 RNA, 其特征是用 SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.116 作为引物, 经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成。

3. 权利要求 1 或 2 所述的 DNA 和 RNA 的制备方法, 包括如下操作:

严重急性呼吸道综合症病原体冠状病毒的收集和处理; 严重急性呼吸道综合症病原体冠状病毒 cDNA 的构建; 长链 DNA 的制备; 双链 dsRNA 的制备; 短链 RNA 或 DNA 的合成。

4. 权利要求 3 所述的 DNA 和 RNA 的制备方法, 其中在长链 DNA 的制备中采用 PCR 方法制备 DNA 模板, 所述 PCR 方法中所使用的引物为 SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.116 所示序列。

5. 用权利要求 1 或 2 所述的 DNA 和 RNA 制备严重急性呼吸道综合症病原冠状病毒 RNA 干扰药物制剂的用途。

6. 权利要求 5 所述的用途, 其中:

SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.4 和 SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.80 所示的 66 个 RNA/DNA 序列, 以及用 SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.80 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA, 用于制备抑制或干扰冠状病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRP) 合成的药物制剂;

SEQ ID NO.5~SEQ ID NO.8 所示的 4 个 RNA/DNA 序列, 以及用 SEQ ID NO.81~SEQ ID NO.86 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA, 用于制备抑制或干扰冠状病毒包装蛋白合成的药物制剂;

SEQ ID NO.9~SEQ ID NO.10 所示的 2 个 RNA/DNA 序列, 以及用 SEQ ID NO.87~SEQ ID NO.98 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA, 用于制备抑制或干扰冠状病毒刺突糖蛋白合成的药物制剂;

SEQ ID NO. 11~SEQ ID NO. 12 所示的 2 个 RNA/DNA 序列, 以及用 SEQ ID NO. 99~SEQ ID NO. 102 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA, 用于制备抑制或干扰冠状病毒膜蛋白合成的药物制剂;

SEQ ID NO. 13~SEQ ID NO. 18 所示的 6 个 RNA/DNA 序列, 以及用 SEQ ID NO. 103~SEQ ID NO. 116 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA, 用于制备抑制或干扰冠状病毒其它蛋白合成的药物制剂。

7. 权利要求 5 所述的用途, 其中所述制剂中可包括一种或多种所述的 RNA 或 DNA。

严重急性呼吸道综合症病原冠状病毒 RNA 干扰制剂

技术领域

本发明涉及由冠状病毒引起的严重急性呼吸道综合症（SARS）的系列 RNA 干扰制剂，具体涉及利用转录后基因沉默（PTGS）抑制或干扰 SARS 冠状病毒的 RNA 干扰制剂。

背景技术

严重急性呼吸道综合症（Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS）的病原体是一种冠状病毒（Coronavirus）。已知这种病毒的遗传物质是一条正链核糖核酸，由近 3 万个碱基组成。目前除成功分离出病原体冠状病毒外，还测定了病毒核糖核酸的全序列。但现在尚无特效的治疗药物问世。

核糖核酸干扰（RNA Interference，以下也简称 RNAi），也称转录后基因沉默机制（Post-transcriptional gene silencing，以下简称 PTGS），是近年来发现的一种生物抵御病毒感染的机制。在发生基因沉默的细胞中大多存在特定长度的小分子 RNA（21~25 nt），PTGS 导致细胞质内 RNA 的特异性降解，不同生物的 PTGS 相关基因及产物具有很高的相似性，基因沉默能够在细胞间传播并能以表型遗传的方式传递给下一代等。是一种抵抗外来核酸(如冠状病毒和转座子)入侵的共同的防御机制¹⁻¹⁹。

目前，已经有一些科学家将转录后基因沉默（PTGS）机制应用于抗肝炎病毒、癌症和艾滋病毒新药的研究和开发中。采用的方法是，首先人工合成和病毒核糖核酸具有相应序列的大片段双链核糖核酸（dsRNA）或脱氧核糖核酸（dsDNA），或者小片段双链核糖核酸（small interfering RNA, siRNA）或脱氧核糖核酸（small interfering DNA, siDNA），然后将这些大小片段(20-4000bp)的双链核糖核酸引入靶细胞。这些 dsRNA, dsDNA, siRNA 或 siDNA 会诱发靶细胞内的转录后基因沉默机制，将在靶细胞内合成的病毒核糖核酸分解成碎片，从而达到预防和消灭病毒的作用。从事和艾滋病的预防和治疗。

发明内容

本发明的目的是利用转录后基因沉默（PTGS）机制的原理，开发出一类新型预防和治疗

SARS 的药物。

本发明提供了可以诱导转录后基因沉默机制，以抑制或干扰 SARS 冠状病毒 RNA 复制,以及抑制或干扰 SARS 冠状病毒蛋白质合成的制剂，这些制剂中含有和 SARS 冠状病毒遗传物质相适应的 RNA 或 DNA (dsRNA, dsDNA, siRNA 或 siDNA) 及其衍生物。

所述 SARS 冠状病毒 RNA 复制具体指：合成依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRP)；

所述 SARS 冠状病毒蛋白质包括：SARS 冠状病毒包装蛋白、SARS 冠状病毒刺突糖蛋白、SARS 冠状病毒膜蛋白，以及 SARS 冠状病毒其它蛋白。

所述可以诱导转录后基因沉默机制抑制或干扰 SARS 冠状病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRP) 合成的 RNA 或 DNA 及其衍生物的序列为 SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.4 和 SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.80 所示的 66 个 RNA/DNA 序列，以及用 SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.80 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA(dsRNA 或 dsDNA)；

所述可以诱导转录后基因沉默机制抑制或干扰 SARS 冠状病毒包装蛋白合成的 RNA 或 DNA 及其衍生物的序列为 SEQ ID NO.4~SEQ ID NO.8 所示的 4 个 RNA/DNA 序列，以及用 SEQ ID NO.81~SEQ ID NO.86 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA(dsRNA 或 dsDNA)；

所述可以诱导转录后基因沉默机制抑制或干扰 SARS 冠状病毒刺突糖蛋白合成的 RNA 或 DNA 及其衍生物的序列为 SEQ ID NO.9~SEQ ID NO.10 所示的 2 个 RNA/DNA 序列，以及用 SEQ ID NO.87~SEQ ID NO.98 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA(dsRNA 或 dsDNA)；

所述可以诱导转录后基因沉默机制抑制或干扰 SARS 冠状病毒膜蛋白合成的 RNA 或 DNA 及其衍生物的序列为 SEQ ID NO.11~SEQ ID NO.12 所示的 2 个 RNA/DNA 序列，以及用 SEQ ID NO.99~SEQ ID NO.102 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA(dsRNA 或 dsDNA)；

所述可以诱导转录后基因沉默机制抑制或干扰 SARS 冠状病毒其它蛋白合成的 RNA 或 DNA 及其衍生物的序列为 SEQ ID NO.13~SEQ ID NO.18 所示的 6 个 RNA/DNA 序列，以及用 SEQ ID NO.103~SEQ ID NO.116 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA(dsRNA 或 dsDNA)；

所述制剂可包括以上一种或多种上述 SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.80 所示序列的 RNA 或 DNA，以及用 SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.116 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法

所合成的长链 DNA 和 RNA(dsRNA 或 dsDNA)。

上述 SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.80 所示序列的 RNA 或 DNA, 以及用 SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.116 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA(dsRNA 或 dsDNA) 的制备方法的制备方法包括严重急性呼吸道综合症病原体冠状病毒收集和处理, 严重急性呼吸道综合症病原体冠状病毒 cDNA 的构建, 长链 DNA 的制备, 双链 dsRNA 的制备, 短链 RNA 或 DNA 的合成。

将本发明提供的上述 SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.80 所示序列的 RNA 或 DNA, 以及用 SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.116 作为引物经多聚酶链式反应和 RNA 合成的方法所合成的长链 DNA 和 RNA(dsRNA 或 dsDNA) 的其中一种或多种组合, 与药物可接受的载体及辅剂配合, 可制备出预防和治疗 SARS 的药物。如将这些 RNA 或 DNA 溶解于萨斯耐™滴眼液辅剂、喷鼻剂辅剂、口腔喷雾剂辅剂, 可制成相应的药物制剂。

发明详述

1 长链 DNA 的制备

1.1 SARS 冠状病毒的培养和 RNA 分离:

SARS 冠状病毒取自确诊病人的粪便, 培养所用细胞株 Vero E6 购自 ATCC (American Type Culture Collection)。将细胞接种于含有 10% 牛血清的 Eagle's 培养基(2 mM L-glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5g/L sodium bicarbonate), 在 37°C 5% 的二氧化碳培养箱中培养, 每 2 天换一次培养液。当细胞密度达到 1×10^4 /毫升时, 接种 SARS 冠状病毒。继续培养大约 7 天, 每 2 天换一次培养液。在接种后第 48 小时即可观察到病毒感染的迹象。

取 10 毫升被病毒感染的 Vero E6 细胞 (10^6 cells/mL) 离心沉淀细胞, 用 1 ml 培养液洗涤后将细胞重悬浮于 0.2 mL, 加入 1 mL TRIZOL Reagent (Life Technology) 在 15-30°C 保温 5-10 分钟, 再加入 0.2 mL 氯仿轻柔振摇 15 秒钟, 然后在 15-30°C 保温 2-5 分钟, 在 2-8°C $12,000 \times g$ 离心 15 分钟, 取上清液并移入一个新的 1.5 mL 离心管中, 加入 0.5 mL 异丙醇在 15-30°C 保温 5-10 分钟, 在 2-8°C $12,000 \times g$ 离心 5-10 分钟, 弃上清液, 沉淀用 1 mL 75% 乙醇洗涤, 在 2-8°C $7,500 \times g$ 离心 5 分钟, 弃上清液, 沉淀干燥 10-15 分钟, 加入无 Rnase 的水在 55-60°C 保温 10-30 分钟, 使 RNA 充分溶解。

1.2 cDNA 的合成:

在小试管中加入总 RNA 0.1-5 μ g, oligo(dT)₁₈ 5 μ g, 去离子水 (nuclease free) 至 110 μ l, 70°C 水浴保温 5 分钟, 冰浴冷却, 以序加 5 X 反应试剂 40 μ l, 10mM 4 dNTP 20 μ l (1.0mM 终浓度), RNase 抑制剂 200u, 去离子水(nuclease free)至 190 μ l, 在 37°C 保温 5 分钟, 加入 400 单位的反转录酶, 在 37°C 保温 60 分钟, 70°C 保温 10 分钟, 冰浴保存, 此为初反应物。

在灭菌的 0.5ml 离心管中依次加入: 45 μ l 初反应物; 20 μ l 10 \times 缓冲液, 8 μ l dNTP 混合物, 114 μ l 蒸馏水, 2 μ l RNA 酶 H(1.5 U/ μ l), 11 μ l 脱氧核糖核酸(DNA)聚合酶 I(9.0 U/ μ l), 混匀后 16°C 孵育 2.5 h。反应结束后加入 23 μ l dNTP 混合物和 2 μ l Pfu DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ l), 72°C 孵育 30 min, 以补平 cDNA 末端。反应结束后采用酚:氯仿(1:1)抽提和乙醇沉淀的方法, 得到 cDNA 沉淀, 再重悬浮于 TE 缓冲液中, 按 10 μ l/管 分装, -20°C 保存。

1.3 PCR (Polymerase Chain Reaction, 多聚酶链式反应) 制备 DNA 模板:

采用热启动 PCR(Hot Start PCR), 反转录 PCR(RT-PCR), 和即时 PCR(Real Time PCR)等几种 PCR 方法。

1.4 SARS 冠状病毒核酸引物的设计及序列

本发明中所有 PCR 所使用的引物, 都是根据已经公布的 SARS 冠状病毒 RNA 序列 (Genbank Accession AY274119.3) 设计的。下面是 SARS 冠状病毒几种相关蛋白质基因有关 PCR 所使用引物的有关资料。这些基因包括 SARS 冠状病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRP), SARS 冠状病毒包装蛋白, SARS 冠状病毒刺突糖蛋白, SARS 冠状病毒膜蛋白, 以及 SARS 冠状病毒其它蛋白。

1.4.1 SARS 冠状病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRP):

正向引物 (共 31 个, 序列号 SEQ ID NO.19~49)

| 名称 | 序列 | 基因组排列 |
|----------|------------------------------|-----------|
| RdRP 001 | 5' -ctacccaggaaaagccaacca-3' | 1-21 |
| RdRP 002 | 5' -cttagtgacgagcttgccac-3' | 681-701 |
| RdRP 003 | 5' -attggacctgagcatagtgtt-3' | 1381-1401 |

| | | |
|----------|--------------------------------|-------------|
| RdRP 004 | 5' - agtgggtgtctaattcttttg-3' | 2081-2101 |
| RdRP 005 | 5' -tgagcttgatgaacgtgtga-3' | 2781-2801 |
| RdRP006 | 5' -ggagggctctgttgctttct-3' | 3481-3501 |
| RdRP007 | 5' -gctaagactgctttaagaaa-3' | 4201-4221 |
| RdRP008 | 5' - tggacaacactaatctccaca-3' | 4901-4921 |
| RdRP009 | 5' -gtctgcaccacctgctgagta-3' | 5601-5621 |
| RdRP010 | 5' -tgtgaaagtcaacaaccacc-3' | 6301-6321 |
| RdRP011 | 5' - ctaacgttactactatggatt-3' | 7001-7021 |
| RdRP012 | 5' -ggctggcaaaagacctatga-3' | 7701-7721 |
| RdRP013 | 5' -agactaactgtgctacaact-3' | 8401-8421 |
| RdRP014 | 5' - gagtagtaacaacttttgatg -3' | 9101-9121 |
| RdRP015 | 5' -tcttgctctatataacaagta-3' | 9801-9821 |
| RdRP016 | 5' -gaaggtaaattctatggcca-3' | 10501-10521 |
| RdRP017 | 5' - tgtctggttataggcttaagg -3' | 11201-11221 |
| RdRP018 | 5' -tttcgagaagatggtttctct-3' | 11901-11921 |
| RdRP019 | 5' -aataatgaactgagtcagta-3' | 12601-12621 |
| RdRP020 | 5' - gaatgtggaagggttatggct-3' | 13301-13321 |
| RdRP021 | 5' -tggtacgatttcggtgatttc-3' | 14001-14021 |
| RdRP022 | 5' -ctatcagtgattatgactatt-3' | 14701-14721 |
| RdRP023 | 5' - cggatgatgctacaactgetta-3' | 15401-15421 |
| RdRP024 | 5' -tgggaacctgagttttatgag-3' | 16101-16121 |
| RdRP025 | 5' -acaagttgaatgttggtgatt-3' | 16801-16821 |
| RdRP026 | 5' - cactgtgagtgcttagttta-3' | 17501-17521 |
| RdRP027 | 5' -gttcgtgcgtggattggcttt-3' | 18201-18221 |
| RdRP028 | 5' -ttgtgaagtctgcattgcttg-3' | 18901-18921 |
| RdRP029 | 5' - acctgtttccatcattaataa-3' | 19601-19621 |
| RdRP030 | 5' -aagcgctcacaaagattcacca-3' | 20301-20321 |
| RdRP031 | 5' -atgactctaaagaagggtttt-3' | 21001-21021 |

反向引物 (共 31 个, 序列号 SEQ ID NO.50~80)

| 名称 | 序列 | 基因组排列 |
|---------|------------------------------|-------------|
| RdRp032 | 5'-cagtgccaagctcgtcaccta-3' | 703-683 |
| RdRp033 | 5'-gcaacactatgctgaggtcca-3' | 1403-1383 |
| RdRp034 | 5'-gccc aaaagattagacaacc-3' | 2102-2183 |
| RdRp035 | 5'-tgtaacacgttcatcaagct-3' | 2802-2783 |
| RdRp036 | 5'-ccagaaagcaacaagaccct-3' | 3503-3483 |
| RdRp037 | 5'-catttcttaagagcagttcta-3' | 4223-4203 |
| RdRp038 | 5'-tgtgtggagattatgtgtc-3' | 4922-4903 |
| RdRp039 | 5'-tatactcagcaggtggtgcag-3' | 5623-5603 |
| RdRp040 | 5'-gaggtgggtgttgactttca-3' | 6323-6303 |
| RdRp041 | 5'-gaaatccatagtagtaacgtt-3' | 7023-7003 |
| RdRp042 | 5'-tctgataggtctttgaccag-3' | 7723-7703 |
| RdRp043 | 5'-ctagttgtagcacaagttagt-3' | 8423-8403 |
| RdRp044 | 5'-agcatcaaaagttgttactac-3' | 9123-9103 |
| RdRp045 | 5'-tgtacttgttatatagagcaa-3' | 9823-9803 |
| RdRp046 | 5'-aatggaccatagaatttacct-3' | 10523-10503 |
| RdRp047 | 5'-atccttaagcctataaccaga-3' | 11223-11203 |
| RdRp048 | 5'-aaagagaaaccatcttctcga-3' | 11923-11903 |
| RdRp049 | 5'-gctactggactcagttcatta-3' | 12623-12603 |
| RdRp050 | 5'-agagccataacctttccacat-3' | 13323-13303 |
| RdRp051 | 5'-acgaaatcaccgaaatcgtag-3' | 14023-14003 |
| RdRp052 | 5'-ataatagtcataatcactgat-3' | 14723-14703 |
| RdRp053 | 5'-cataagcagttgtagcatcac-3' | 15423-15403 |
| RdRp054 | 5'-ttctaagtattgtaaataca-3' | 16123-16103 |
| RdRp055 | 5'-gtaatcaccaacattcaactt-3' | 16823-16803 |
| RdRp056 | 5'-cataaactaaagcactcacag-3' | 17523-17503 |
| RdRp057 | 5'-tcaaagccaatccacgcacga-3' | 18223-18203 |
| RdRp058 | 5'-agtaagcaatgcagacttcac-3' | 18923-18903 |
| RdRp059 | 5'-cattcttaatgatggaaacag-3' | 19623-19603 |
| RdRp060 | 5'-agtggatgaatcttgtgagcgc-3' | 20323-20303 |

RdRp061 5'-gaaaaacccttcttagagtc-3' 21023-21003
 RdRp062 5'-gcaccgggtcaaggctcacttc-3' 21492-21473

1.4.2 SARS 冠状病毒包装蛋白:

正向引物 (共 3 个, 序列号 SEQ ID NO.81~83)

| 名称 | 序列 | 基因组排列 |
|------|-----------------------------|-------------|
| N001 | 5'-acgaacaaattaaaatgtctg-3' | 28091-29011 |
| N002 | 5'-acagattgaaccagcttgaga-3' | 28781-28801 |
| N003 | 5'-agtggagcttctgctgattca-3' | 29341-29361 |

反向引物 (共 3 个, 序列号 SEQ ID NO.84~86)

| 名称 | 序列 | 基因组排列 |
|------|-----------------------------|-------------|
| N004 | 5'-gttgtgtgtggcggttaccag-3' | 28831-28811 |
| N005 | 5'-tgaatcagcagaagctccact-3' | 29341-29361 |
| N006 | 5'-ttgtcattctcctaagaagc-3' | 29715-29695 |

1.4.3 SARS 冠状病毒刺突糖蛋白:

正向引物 (共 6 个, 序列号 SEQ ID NO.87~92)

| 名称 | 序列 | 基因组排列 |
|------|-----------------------------|-------------|
| S001 | 5'-attatttcttactctcactg-3' | 21491-21511 |
| S002 | 5'-tacagcctttcacctgctca-3' | 22181-22201 |
| S003 | 5'-ttaattgtattggccattaa-3' | 22891-22911 |
| S004 | 5'-tacagaagtaatgcctgtttc-3' | 23591-23601 |
| S005 | 5'-acacacttgtaaacactta-3' | 24301-24321 |
| S006 | 5'-aatgaggtcgctaaaattta-3' | 24981-25001 |

反向引物 (共 6 个, 序列号 SEQ ID NO.93~98)

| 名称 | 序列 | 基因组排列 |
|----|----|-------|
|----|----|-------|

| | | |
|------|------------------------------|-------------|
| S007 | 5'-ctgacgtgccccaaatgtctt-3' | 22221-22201 |
| S008 | 5'-ccataatcatttaattggccaa-3' | 22921-22901 |
| S009 | 5'-atattacaatctacggaggtt-3' | 23641-23621 |
| S010 | 5'-gcacacttgaaattgcaccaa-3' | 24331-24311 |
| S011 | 5'-catatttcccaattcttgaa-3' | 25041-25021 |
| S012 | 5'-agagtaaaaaatctcataaac-3' | 25281-25261 |

1.4.4 SARS 冠状病毒膜蛋白:

正向引物 (共 2 个, 序列号 SEQ ID NO.99~100)

| 名称 | 序列 | 基因组排列 |
|------|-----------------------------|-------------|
| M001 | 5'-ttattctggttggaacttta-3' | 26351-26371 |
| M002 | 5'-attgtgaccagaccgctcatg-3' | 26761-26961 |

反向引物 (共 2 个, 序列号 SEQ ID NO.101~102)

| 名称 | 序列 | 基因组排列 |
|------|-----------------------------|-------------|
| M003 | 5'-gatcacagcaccaatgacaag-3' | 26811-26791 |
| M004 | 5'-atatctctgtattgtaacct-3' | 28011-27081 |

1.4.5 SARS 冠状病毒其它蛋白:

正向引物 (共 7 个, 序列号 SEQ ID NO.103~109)

| 名称 | 序列 | 基因组排列 |
|--------|-----------------------------|-------------|
| UPA001 | 5'-gtttatgagatttttactct-3' | 25261-25281 |
| UPA002 | 5'-ctaccaaattggtggttattc-3' | 25801-25821 |
| UPB001 | 5'-caaatccaagaacccattact-3' | 25651-25671 |
| E001 | 5'-tgatgagccgacgacgactac-3' | 26041-26061 |
| UPC001 | 5'-gttgactccaggttacaata-3' | 27071-27091 |
| UPD001 | 5'-aaaattattctcttcctgaca-3' | 27261-27281 |
| UPE001 | 5'-gtacctcatgaaggcacca-3' | 28031-28051 |

反向引物（共 7 个，序列号 SEQ ID NO.110~116）

| 名称 | 序列 | 基因组排列 |
|--------|-----------------------------|-------------|
| UPA003 | 5'-tagctttaacacctgagtgc-3' | 25851-25831 |
| UPA004 | 5'-ttaagctcctcaacggtaat-3' | 26421-26401 |
| UPB002 | 5'-ggatggctagtgtagtagca-3' | 26201-26181 |
| E002 | 5'-gtctgccatgataagcaatgt-3' | 26391-26371 |
| UPC002 | 5'-caagatgtaaatacaatcaat-3' | 27301-27281 |
| UPD002 | 5'-aggaatagcagaaaggctaaa-3' | 27681-27661 |
| UPE002 | 5'-ttctgggccagttcctaggta-3' | 28461-28441 |

1.5 PCR 产物情况:

以上述正反向引物进行 PCR 反应，所得的产品，即经 PCR 合成的 DNA 的长度，在 200--4000 个碱基对之间。以编码 SARS 冠状病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRP）的基因为例，如果以 RdRP001 和 RdRP032 作为正反向引物，则 PCR 产品 DNA 的长度为 700 个碱基对；如果以 RdRP001 和 RdRP033 作为正反向引物，则 PCR 产品 DNA 的长度为 1400 个碱基对；如果以 RdRP001 和 RdRP034 作为正反向引物，则 PCR 产品 DNA 的长度为 2100 个碱基对；如果以 RdRP005 和 RdRP040 作为正反向引物，则 PCR 产品 DNA 的长度为 3700 个碱基对；以此类推。

PCR 反应混合液（100 μ l）包括：5 μ l cDNA（5 ng/ μ l），10 μ l 10 倍浓度的 PCR 反应缓冲液，正向引物（25 pmol/ μ l）4 μ l，反向引物（25 pmol/ μ l）4 μ l，dNTPs（dTTP, dATP, dGTP, dCTP, 各 2.5 mM）8 μ l，Tag 多聚酶 0.5 μ l（2 单位），加水至 100 μ l。

PCR 反应条件：①94 °C 变性 2 分钟，②94 °C 1 分钟，③合适的粘和温度（Annealing Temperature, 每种引物所要求的粘和温度不一样，一般在 50-60 °C）30 秒，④72 °C 2-15 分钟（依每个 PCR 反应的要求决定），⑤重复②——④30-45 次（依每个 PCR 反应的要求决定），⑥72 °C 10-30 分钟（依每个 PCR 反应的要求决定）。

PCR 产物 DNA 提取：PCR 反应结束后采用酚：氯仿（1：1）抽提和乙醇沉淀的方法提取 DNA，再重悬浮于 TE 缓冲液中，按 10 再重悬浮于 TE 缓冲液中，按 10 再重悬浮于 TE 缓冲液中，按 10 μ l/管 分装，-20 °C 保存。

2 双链 dsRNA 的制备:

2.1 小批量制备:

小试管中加入下列反应液: 5 倍反应缓冲液 20 μ l, PCR 合成的 DNA 30 μ l, NTPs (TTP, ATP, GTP, CTP, 各 2.5 mM) 20 μ l, T7 或 T3 多聚酶 40 单位 (Stratagene 产品), 加水至 100 μ l。

上述试剂混合好后, 在 37°C 保温 4 小时或过夜, 反应结束后采用酚: 氯仿(1:1)抽提和乙醇沉淀的方法提取 RNA, 再重悬浮于萨斯耐辅剂中备用。

2.2 大批量制备:

试管中加入下列反应液: 5 倍反应缓冲液 200 μ l, PCR 合成的 DNA 300 μ l, NTPs (TTP, ATP, GTP, CTP, 各 2.5 mM) 200 μ l, T7 或 T3 多聚酶 400 单位 (Stratagene 产品), 加水至 1000 μ l。上述试剂混合好后, 在 37°C 保温 4 小时或过夜, 反应结束后采用酚: 氯仿(1:1)抽提和乙醇沉淀的方法提取 RNA, 再重悬浮于萨斯耐辅剂中备用。

合成的双链 RNA 干扰制剂的种类和数量如下表所示, 共 222 个不同长度和序列的双链 RNA。

| 基因 | 双链 RNA 的数量 |
|---------------------------|------------|
| SARS 冠状病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 | 191 |
| SARS 冠状病毒包装蛋白 | 6 |
| SARS 冠状病毒刺突糖蛋白 | 14 |
| SARS 冠状病毒膜蛋白 | 3 |
| SARS 冠状病毒其它蛋白 | 8 |

3 小片段 RNA(siRNA)或 DNA(siDNA)的干扰制剂的制备:

3.1 制备方法

小片段 RNA(siRNA)或 DNA(siDNA)利用 DNA 合成仪进行合成。RNA 干扰制剂及其衍生物的序列的设计取材来自于 SARS 冠状病毒 RNA (Genbank Accession AY274119.3)。单链的 RNA 或 DNA 在自然情况下可以形成所谓的“发夹”型的结构, 组成 20-24 个碱基对的结构。而二条具互补性的单链在合成以后, 可以通过“退火”的方法使他们形成双链 (见附图 2)。

合成后采用酚: 氯仿(1:1)抽提和乙醇沉淀的方法提取 RNA 或 DNA, 再重悬浮于萨斯耐辅剂中备用。

3.2 本发明中小片段 RNA(siRNA)或 DNA(siDNA)及其衍生物的序列为:

3.2.1 抑制或干扰冠状病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRP) 合成的小片段 RNA (序列号 SEQ ID NO.1~4, 名称 SARSTOP101-104)

3.2.1.1 SARSTOP101

5' TCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTTCAAGAGACACAGATTTTAAAGTTCGTTTAGA
3'

3.2.1.2 SARSTOP102

5' TAAACGAACTTTAAAATCTGTTTCAAGGAGAACAGATTTTAAAGTTCGTTTA 3'

3.2.1.3 SARSTOP103

5' ACAAAGTGCTTAATGAAAAGTTTCAAGGAGAACTTTTCATTAAGAACTTTGT 3'

3.2.1.4 SARSTOP104

5' TAACTAAATACACAATGGCTGTTCAAGGAGACAGCCATTGTGTATTTAGTTA 3'

需要说明的是,在第一部分中所提到的用于合成 SARS 冠状病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRP) 的 PCR 的引物,也可以通过“退火”的方法使他们形成双链,从而组合成可以诱导转录后基因沉默机制抑制或干扰冠状病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRP) 合成的 RNA 干扰制剂。它们的组合排列如下表所述。

| 名称 | 组合 | 名称 | 组合 |
|------------|-------------------|------------|-------------------|
| SARSTOP105 | RdRP002 和 RdRp032 | SARSTOP120 | RdRP017 和 RdRp047 |
| SARSTOP106 | RdRP003 和 RdRp033 | SARSTOP121 | RdRP018 和 RdRp048 |
| SARSTOP107 | RdRP004 和 RdRp034 | SARSTOP123 | RdRP019 和 RdRp049 |
| SARSTOP108 | RdRP005 和 RdRp035 | SARSTOP124 | RdRP020 和 RdRp050 |
| SARSTOP109 | RdRP006 和 RdRp036 | SARSTOP125 | RdRP021 和 RdRp051 |
| SARSTOP110 | RdRP007 和 RdRp037 | SARSTOP126 | RdRP022 和 RdRp052 |
| SARSTOP111 | RdRP008 和 RdRp038 | SARSTOP127 | RdRP023 和 RdRp053 |
| SARSTOP112 | RdRP009 和 RdRp038 | SARSTOP128 | RdRP024 和 RdRp054 |
| SARSTOP113 | RdRP010 和 RdRp040 | SARSTOP129 | RdRP025 和 RdRp055 |
| SARSTOP114 | RdRP011 和 RdRp041 | SARSTOP130 | RdRP026 和 RdRp056 |

| | | | |
|------------|-------------------|------------|-------------------|
| SARSTOP115 | RdRP012 和 RdRp042 | SARSTOP131 | RdRP027 和 RdRp057 |
| SARSTOP116 | RdRP013 和 RdRp043 | SARSTOP132 | RdRP028 和 RdRp058 |
| SARSTOP117 | RdRP014 和 RdRp044 | SARSTOP133 | RdRP029 和 RdRp059 |
| SARSTOP118 | RdRP015 和 RdRp045 | SARSTOP134 | RdRP30 和 RdRp060 |
| SARSTOP119 | RdRP016 和 RdRp046 | SARSTOP135 | RdRP31 和 RdRp061 |

3.2.2 诱导转录后基因沉默机制抑制或干扰冠状病毒包装蛋白合成的小片段 RNA 干扰制剂及其衍生物（序列号 SEQ ID NO.~8，名称 SARSTOP201-204）

3.2.2.1 SARSTOP201

5' TAAATAAACGAACAAATTAAATTCAAGGAGATTTAATTTGTTTCGTTTATTTA 3'

3.2.2.2 SARSTOP202

5' TAATGGACCCCAATCAAACCATTCAAGGAGATGGTTTGATTGGGGTCCATTA 3'

3.2.2.3 SARSTOP203

5' ATTCAACTGACAATAACCAGATTCAAGGAGATCTGGTTATTGTCAGTTGAAT 3'

3.2.2.4 SARSTOP204

5' ATTACATTTGGTGGACCCACATTCAAGGAGATGTGGGTCCACCAAATGTAAT 3'

3.2.3 可以诱导转录后基因沉默机制抑制或干扰冠状病毒刺突糖蛋白合成的小片段 RNA 干扰制剂及其衍生物（序列号 SEQ ID NO.9~10，名称 SARSTOP01-303）

3.2.3.1 SARSTOP301

5' CTTGTTAACAACCTAAACGAACCTCAAGGAGAGTTCGTTTAGTTGTTAACAAG 3'

3.2.3.2 SARSTOP302

5' TTATTTTCTTATTATTTCTTATTCAAGGAGATAAGAAATAATAAGAAAATAA 3'

3.2.4 可以诱导转录后基因沉默机制抑制或干扰冠状病毒膜蛋白合成的小片段 RNA 干扰制剂及其衍生物（序列号 SEQ ID NO.11~12，名称 SARSTOP401-402）：

3.2.4.1 SARSTOP401

5' TCTGGTCTAAACGAACCTAATTTCAAGGAGAAGTTAGTTTCGTTTAGACCAGA 3'

3.2.4.2 SARSTOP402

5' TTTTGTACATAATAAAGCTTTTCAAGGAGAAAGCTTTATTATGTACAAAAA 3'

3.2.5 可以诱导转录后基因沉默机制抑制或干扰冠状病毒其它蛋白合成的小片段 RNA 干扰制剂及其衍生物（序列号 SEQ ID NO.13~18，名称 SARSTOP501-506）：

3.2.5.1 SARSTOP501

5' ACATTACACATAAACGAACCTTTCAAGGAGAAAGTTCGTTTATGTGTAATGT 3'

3.2.5.2 SARSTOP502

5' ATTTGTTTATGAGATTTTTTATTCAAGGAGATAAAAAATCTCATAAACAAAT 3'

3.2.5.3 SARSTOP503

5' TTGGAAACTATAAATTAAATATTCAAGGAGATATTTAATTTATAGTTTCCAA 3'

3.2.5.4 SARSTOP504

5' ATGTTTCATCTTGTTGACTTCTTCAAGGAGAGAAGTCAACAAGATGAAACAT 3'

3.2.5.5 SARSTOP505

5' TTAGATTATCCATAAAACGAATTCAAGGAGATTTCGTTTTATGGATAATCTAA 3'

3.2.5.6 SARSTOP506

5' ATGAAAATTATTCTCTTCCTGTTCAAGGAGACAGGAAGAGAATAATTTTCAT 3'

上述 1-5 中所述的序列，每个序列可以单独使用，也可以和其它序列组合使用。

3.3 本发明中新的抑制或干扰冠状病毒繁殖的小片段 RNA 干扰制剂及其衍生物的定义是：以 1-5 中所述的抑制或干扰冠状病毒繁殖的 RNA 干扰制剂及其衍生物为基本单元，将这些基本单元经排列组合而形成的制剂及其衍生物。

4 辅剂

本发明所用辅剂可以是任何药物可接受的载体及辅剂。前述萨斯耐辅剂可从市场上购到，其组成为：

1) 萨斯耐™滴眼液辅剂：0.9%氯化钠，0.025% 乙二胺四乙酸二钠（Disodium EDTA），0.00003% 聚氨基丙基双胍（Polyaminopropyl Biguanide），微量氯化钾；

2) 萨斯耐™喷鼻剂辅剂: 0.05% Tetrahydrozoline Hydrochloride, (微量), 硼酸钠 (Sodium Borate) 微量, 氯化钠 微量, 盐酸苯甲烷铵 Benzalkonium, Chloride(微量);

3) 萨斯耐™口腔喷雾剂辅剂: 2% 安息香酸钠 (Sodium Benzoate), 0.25% 硫酸月桂醇钠 (Sodium Lauryl Sulfate), 0.2% 水杨酸钠 (Sodium Salicylate), 人造香精 Artificial flacour(微量), 糖精钠 (Saccharin Sodium(微量), 重碳酸钠 (Sodium Bicarbonate(微量), 硼酸钠 (Sodium Borate) 微量, 山梨醇溶液 (Sorbitol Solution 微量)。

5 本发明中的 RNA 干扰制剂中辅剂对严重急性呼吸道综合症病原冠状病毒的作用

5.1 SARS 冠状病毒的培养:

培养所用细胞株 Vero E6 购自 ATCC (American Type Culture Collection)。将细胞接种于含有 10% 牛血清的 Eagle's 培养基 (2 mM L-glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5g/L sodium bicarbonate), 在 37°C 5% 的二氧化碳培养箱中培养, 每 2 天换一次培养液。当细胞密度达到 1×10^4 /毫升时, 接种 SARS 冠状病毒。继续培养大约 14 天, 每 2 天换一次培养液。

5.2 对照实验: 要检验几种萨斯耐的辅剂对 SARS 病毒的繁殖是否造成影响。

本实验涉及到四项不同的对照实验: ①如第一部分中对病毒的培养, 即实验只涉及病毒和细胞两个部分; ②除了细胞外, 不用病毒对细胞进行感染, 而用萨斯耐的辅剂加入培养液中, 观察这些萨斯耐的辅剂对细胞生长的影响; ③在第②项对照实验的基础上, 即培养基中含有萨斯耐的辅剂的情况下, 用病毒感染细胞, 观察这些萨斯耐的辅剂对病毒感染率的影响; ④观察这些萨斯耐的辅剂对已经感染了病毒的细胞生长的影响, 即当病毒感染了细胞以后, 再在培养液中加入萨斯耐的辅剂, 然后观察这些萨斯耐的辅剂对细胞生长和病毒感染率的影响。

5.2.1 对照实验 1:

病毒的培养如上述。在感染后的第 2 天开始, 将感染了病毒的细胞收集后, 用戊二醛或甲醛固定, 醋酸双氧铀 (Uranyl Acetate) 或磷钨酸 (Phosphotungstic Acid) 负染, 直接用电子显微镜观察, 发现细胞内有大量的冠状病毒颗粒。同时用 PCR 检测的方法 (使用德国 Artus-Biotech 提供的试剂盒, 操作方法见该公司提供的使用说明书), 检测到 SARS 冠状病毒特异的 DNA 片段, 证明该感染细胞的病毒是 SARS 冠状病毒。下表是实验结果的总结。结果表明, 在接种 72 小时后, 细胞内的病毒数达到最多。

| 程度 检测 | 接种时间 (小时) | | | | | | |
|----------|-----------|----|----|----|-----|------|------|
| | 12 | 24 | 36 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| 电镜观察 | - | - | + | ++ | +++ | +++ | +++ |
| PCR 检测 | - | - | - | ++ | +++ | ++++ | ++++ |

5.2.2 对照实验 2: 萨斯耐的辅剂对细胞生长的影响。

在细胞成长期间, 在培养基中加入萨斯耐的辅剂, 观察萨斯耐的辅剂对细胞生长的影响。在培养基中接种 Vero E6 细胞后, 在第 5 天于培养基中加入萨斯耐的辅剂。实验表明, 当萨斯耐的辅剂的体积占培养基体积 (V/V) 的 20% 以下时, 对细胞生长没有影响; 达到培养基总体积的 40% (V/V) 或以上时, 会减缓细胞的生长, 但并不破坏细胞的结构。

5.2.3 对照实验 3: 萨斯耐的辅剂对病毒感染率的影响。

在接种 SARS 病毒 24 小时前, 加入 10% (V/V) 体积的萨斯耐的辅剂, 然后观察病毒感染率, 并和未加萨斯耐的辅剂的培养进行比较。实验统计结果表明, 10% 体积的萨斯耐的辅剂的存在, 对病毒感染率没有影响。

5.2.4 对照实验 4: 萨斯耐的辅剂对已经感染了病毒的细胞生长的影响。

在病毒感染细胞后, 于不同时间在培养基中加入 10% (V/V) 的萨斯耐的辅剂, 观察病毒感染率。实验表明, 萨斯耐辅剂对病毒感染率没有影响 (见下表)。

| 程度 处理 | 接种时间 (小时) | | | | | | |
|----------|-----------|----|----|----|-----|-----|-----|
| | 12 | 24 | 36 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| 无辅剂 | - | - | + | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 有辅剂 | - | - | + | ++ | +++ | +++ | +++ |

6 RNA 干扰制剂对严重急性呼吸道综合症病原冠状病毒感染细胞前、后的影响

在确定萨斯耐辅剂中的其他成分对冠状病毒感染细胞没有影响的基础上, 我们进一步测定的不同组合的 RNA 或 DNA 的制剂对冠状病毒感染细胞的影响。

实验分为二个独立的部分:

第一部分的实验是,在接种病毒之前 24 小时,于培养液中加入溶解于萨斯耐辅剂中的 RNA 或 DNA 的制剂,然后观察 RNA 干扰制剂对严重急性呼吸道综合症病原冠状病毒感染细胞的影响。

第二部分的实验是,在接种病毒之后 24 小时,于培养液中加入溶解于萨斯耐辅剂中的 RNA 或 DNA 的制剂,然后观察 RNA 干扰制剂对严重急性呼吸道综合症病原冠状病毒感染细胞的影响。每一部分的实验又分为三个部分:①同一制剂在不同浓度下的作用;②不同制剂的组合在相同浓度下的作用;③不同制剂的组合在不同浓度下的作用。

6.1 RNA 或 DNA 制剂对 SARS 冠状病毒感染细胞的影响(感染前)

Vero E6 细胞培养如前述。细胞接种于含有 10%牛血清的 Eagle's 培养基(2 mM L-glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5g/L sodium bicarbonate),在 37°C 5% 的二氧化碳培养箱中培养,每 2 天换一次培养液。当细胞密度达到 1×10^4 /毫升时,加入用萨斯耐辅剂配置的 RNA 或 DNA 制剂(培养液中 RNA 或 DNA 制剂的加入量分别为 100ng, 200ng, 400ng, 800ng, 1.2 μ g),对照加入萨斯耐辅剂,24 小时后接种 SARS 冠状病毒。

病毒培养如前述。取感染细胞的培养液,离心 200rpm, 10min, 取上清液 200ul, 以 50 倍做系列稀释,各相当于滴度为 5、25、125、625、3125 和 15625 TCID₅₀/ml (Tissue Culture Infective Dose) 加入 24 孔培养板,每孔加培养液至 1ml,再加入 1×10^4 /ml Vero E6 细胞悬液 0.5ml (含有 RNA 或 DNA 制剂),在 37°C, 5%CO₂ 条件下培养,定期观察细胞病变 (Cytopathic Effect, CPE)。继续培养大约 7 天,每 2 天换一次培养液。

电镜观察如前述。将感染了病毒的细胞收集后,用 2%的戊二醛或甲醛固定,2%醋酸双氧铀(Uranyl Acetate)或磷钨酸 (Phosphotungstic Acid) 负染,直接用电子显微镜观察。

RT-PCR 检测如前述(使用德国 Artus-Biotech 提供的试剂盒,操作方法见该公司提供的使用说明书)。

实验结果概述:

同一制剂在不同浓度下的对 SARS 冠状病毒的作用

实验结果表明,除了有些制剂对病毒滴度没有影响以外,有相当数量的单一制剂在不同的浓度下有降低病毒滴度的显著作用。而当制剂中的 RNA 或 DNA 的长度增加时,效果比较明显。电镜和 RT-PCR 测定结果也证明了上述实验结果。具体原因尚不清楚。

不同制剂的组合物在相同浓度下的对 SARS 冠状病毒的作用

实验结果表明, 不同制剂的组合物在相同浓度下的对 SARS 冠状病毒滴度的影响, 比使用相同浓度的单一制剂要强烈和持久。

不同制剂的组合物在不同浓度下的对 SARS 冠状病毒的作用

实验结果表明, 不同制剂的组合物在不同浓度下的对 SARS 冠状病毒滴度的影响, 比使用相同浓度的单一制剂要强烈和持久。

6.2 RNA 或 DNA 制剂对感染了 SARS 冠状病毒细胞的影响 (感染后)

Vero E6 细胞培养如前述。

病毒培养如前述。取感染细胞的培养液, 离心 200rpm, 10min, 取上清液 200ul, 以 50 倍做系列稀释, 各相当于滴度为 5、25、125、625、3125 和 15625 TCID₅₀ / ml (Tissue Culture Infective Dose) 加入 24 孔培养板, 每孔加培养液至 1ml, 再加入 1×10^4 / ml Vero E6 细胞悬液 0.5ml (含有 RNA 或 DNA 制剂), 在 37℃, 5%CO₂ 条件下培养, 24 小时后加入用 20 μl 萨斯耐辅剂配置的 RNA 或 DNA 制剂, 对照加入 20 μl 萨斯耐辅剂。定期观察细胞病变 (Cytopathic Effect, CPE)。继续培养大约 7 天, 每 2 天换一次培养液。培养液中 RNA 或 DNA 制剂的加入量分别为 100ng, 200ng, 400ng, 800ng, 1.2 μg。

电镜观察如前述。将感染了病毒的细胞收集后, 用 2% 的戊二醛或甲醛固定, 2% 醋酸双氧铀 (Uranyl Acetate) 或磷钨酸 (Phosphotungstic Acid) 负染, 直接用电子显微镜观察。

RT-PCR 检测如前述 (使用德国 Artus-Biotech 提供的试剂盒, 操作方法见该公司提供的使用说明书)。

实验结果概述:

实验表明, 当细胞感染了 SARS 病毒后, RNA 或 DNA 干扰制剂仍然会对病毒的复制和病毒蛋白的合成产生明显的抑制作用。

同一制剂在不同浓度下的对已经感染了 SARS 冠状病毒细胞的作用

基本上和第一部分的结果类似。除了有些制剂对病毒滴度没有影响以外, 有相当数量的单一制剂在不同的浓度下有降低病毒滴度的显著作用。而当制剂中的 RNA 或 DNA 的长度增加时, 效果比较明显。电镜和 RT-PCR 测定结果也证明了上述实验结果。具体原因尚不清楚。

不同制剂制剂的组合在相同浓度下的对已经感染了 SARS 冠状病毒细胞的作用

实验结果表明,不同制剂的组合物在相同浓度下的对 SARS 冠状病毒滴度的影响,比使用相同浓度的单一制剂要强烈和持久。

不同制剂制剂的组合在不同浓度下的对已经感染了 SARS 冠状病毒细胞的作用

实验结果表明,不同制剂的组合物在不同浓度下的对 SARS 冠状病毒滴度的影响,比使用相同浓度的单一制剂要强烈和持久。

本发明提供的严重急性呼吸道综合症病原体冠状病毒病 RNA 干扰制剂,在严重急性呼吸道综合症病原体冠状病毒的诊断,严重急性呼吸道综合症的预防和治疗等方面具有广泛的应用前景。

呼吸道、消化道、生殖和泌尿系统的粘膜是多种病毒侵入人体的第一道关口,如果将该制剂制成药物施用于人体的粘膜,就有可能从根本上切断严重急性呼吸道综合症病原体冠状病毒袭击人体途径,从而达到预防的效果。

优点或效果

本发明提供的干扰和抑制严重急性呼吸道综合症病原体冠状病毒 RNA 复制,以及冠状病毒蛋白质合成的 RNA 干扰制剂,能够用于 SARS 的诊断、预防、治疗,效果明显,开发周期短。具有以下四个特点:

1. 具有特异性抗 SARS 冠状病毒感染作用;
2. 运用近年来分子生物学发展的新型技术—RNA 干扰作用 (RNAi);
3. 治疗方法简单,无明显毒副作用;
4. 适合于正常及高危人群预防,潜伏期病人的抗病毒治疗。

附图说明

图 1 是本发明提供的 RNA 干扰制剂的作用示意图。

表明可实现对 SARS 病原体冠状病毒 RNA 复制的抑制,或者实现对 SARS 病原体冠状病毒有关蛋白质合成的抑制,或者同时抑制病毒的上述两种功能,从而有希望达到预防、治疗和缓解 SARS 病情的作用。

图 2 是 SEQ ID NO.1 的几种存在形式。

表明单链的 RNA 或 DNA 在自然情况下可以形成所谓的“发夹”型的结构,组成 20-24 个

碱基对的结构。而二条具互补性的单链在合成以后，可以通过“退火”的方法使他们形成双链。

具体实施方式

以下结合实施例详细说明本发明的实现，目的在于帮助阅读者理解本发明的设计思想，对本发明的实施范围构成限定。

实施例 1

SARS 冠状病毒的培养和 RNA 分离：

培养所用细胞株 Vero E6 购自 ATCC (American Type Culture Collection)。将细胞接种于含有 10% 牛血清的 Eagle's 培养基(2 mM L-glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5g/L sodium bicarbonate)，在 37°C 5% 的二氧化碳培养箱中培养，每 2 天换一次培养液。当细胞密度达到 1×10^4 /毫升时，接种 SARS 冠状病毒。继续培养大约 14 天，每 2 天换一次培养液。定期观察细胞病变 (Cytopathic Effect, CPE)。

电镜观察如前述。将感染了病毒的细胞收集后，用 2% 的甲醛固定，2% 醋酸双氧铀(Uranyl Acetate)负染，直接用电子显微镜观察。RT-PCR 检测如前述 (使用德国 Artus-Biotech 提供的试剂盒，操作方法见该公司提供的使用说明书)。结果都呈阳性反应。

取 10 毫升被病毒感染的 Vero E6 细胞 (10^6 cells/mL) 离心沉淀细胞，用 1 ml 培养液洗涤后将细胞重悬浮于 0.2 mL，加入 1 mL TRIZOL Reagent (Life Technology) 在 15-30°C 保温 5-10 分钟，再加入 0.2 mL 氯仿轻柔振荡 15 秒钟，然后在 15-30°C 保温 2-5 分钟，在 2-8°C $12,000 \times g$ 离心 15 分钟，取上清液并移入一个新的 1.5 mL 离心管中，加入 0.5 mL 异丙醇在 15-30°C 保温 5-10 分钟，在 2-8°C $12,000 \times g$ 离心 5-10 分钟，弃上清液，沉淀用 1 mL 75% 乙醇洗涤，在 2-8°C $7,500 \times g$ 离心 5 分钟，弃上清液，沉淀干燥 10-15 分钟，加入无 Rnase 的水在 55-60°C 保温 10-30 分钟，使 RNA 充分溶解。

cDNA 的合成：

在小试管中加入总 RNA 0.1-5 μ g, oligo(dT)₁₈ 5 μ g, 去离子水 (nuclease free) 至 110 μ l, 70°C 水浴保温 5 分钟，冰浴冷却，以序加 5 X 反应试剂 40 μ l, 10mM 4 dNTP 20 μ l (1.0mM 终浓度), RNase 抑制剂 200u, 去离子水(nuclease free)至 190 μ l, 在 37°C 保温 5 分钟，加入 400 单位的反转录酶，在 37°C 保温 60 分钟，70°C 保温 10 分钟，冰浴保存，此为初反应物。

在灭菌的 0.5ml 离心管中依次加入：45 μ l 初反应物；20 μ l 10 \times 缓冲液，8 μ l dNTP 混合物，114 μ l 蒸馏水，2 μ l RNA 酶 H(1.5 U/ μ l)，11 μ l 脱氧核糖核酸(DNA)聚合酶 I(9.0 U/ μ l)，混匀后 16 $^{\circ}$ C 孵育 2.5 h。反应结束后加入 23 μ l dNTP 混合物和 2 μ l Pfu DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ l)，72 $^{\circ}$ C 孵育 30 min，以补平 cDNA 末端。反应结束后采用酚：氯仿(1：1)抽提和乙醇沉淀的方法，得到 cDNA 沉淀，再重悬浮于 TE 缓冲液中，按 10 μ l/管 分装，-20 $^{\circ}$ C 保存。

用正向引物 RdRP001 和反向引物 RdRp032 制备 DNA 模板：采用热启动 PCR(Hot Start PCR)。正向引物 RdRP001 的序列为：5' -ctaccaggaagcaacca-3'，而反向引物 RdRp032 的序列为 5'-cagtccaagctcgaccta-3'。PCR 反应混合液 (100 μ l) 包括：5 μ l cDNA (5 ng/ μ l)，10 μ l 10 倍浓度的 PCR 反应缓冲液，正向引物 (25 pmol/ μ l) 4 μ l，反向引物 (25 pmol/ μ l) 4 μ l，dNTPs (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, 各 2.5 mM) 8 μ l，Tag 多聚酶 0.5 μ l (2 单位)，加水至 100 μ l。PCR 反应条件：①94 $^{\circ}$ C 变性 2 分钟，②94 $^{\circ}$ C 1 分钟，③55 $^{\circ}$ C 30 秒，④72 $^{\circ}$ C 2 分钟，⑤重复②——④35 次，⑥72 $^{\circ}$ C 10 分钟。

DNA 提取：PCR 反应结束后采用酚：氯仿(1：1)抽提和乙醇沉淀的方法提取 DNA，再重悬浮于 TE 缓冲液中，按 10 μ l/管 分装，-20 $^{\circ}$ C 保存。所得 DNA 用常规电泳方法检测，并用 DNA 测序的方法证明该段 700 个碱基对的 DNA 是属于我们所感兴趣的 DNA 片段。

双链 dsRNA 的制备：小试管中加入下列反应液：5 倍反应缓冲液 20 μ l，PCR 合成的 DNA 30 μ l，NTPs (TTP, ATP, GTP, CTP, 各 2.5 mM) 20 μ l，T7 多聚酶 40 单位 (Stratagene 产品)，加水至 100 μ l。上述试剂混合好后，在 37 $^{\circ}$ C 保温 4 小时或过夜，反应结束后采用酚：氯仿(1：1)抽提和乙醇沉淀的方法提取 RNA，再重悬浮于萨斯耐滴眼液辅剂中备用。

该 RNA 制剂在不同浓度下的对 SARS 冠状病毒的作用：

Vero E6 细胞培养如前述。细胞接种于含有 10% 牛血清的 Eagle's 培养基(2 mM L-glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5g/L sodium bicarbonate)，在 37 $^{\circ}$ C 5% 的二氧化碳培养箱中培养，每 2 天换一次培养液。当细胞密度达到 1×10^4 /毫升时，加入用萨斯耐滴眼液辅剂配置的 RNA 制剂 (培养液中 RNA 或 DNA 制剂的加入量分别为 100ng, 200ng, 400ng, 800ng, 1.2 μ g)，对照加入萨斯耐滴眼液辅剂，24 小时后接种 SARS 冠状病毒。病毒培

养如前述。取感染细胞的培养液，离心 200rpm，10min，取上清液 200ul，以 50 倍做系列稀释，各相当于滴度为 5、25、125、625、3125 和 15625 TCID₅₀ / ml (Tissue Culture Infective Dose) 加入 24 孔培养板，每孔加培养液至 1ml，再加入 1X10⁶ / ml Vero E6 细胞悬液 0.5ml (含有 RNA 制剂)，在 37℃，5%CO₂ 条件下培养，定期观察细胞病变 (Cytopathic Effect, CPE)。继续培养大约 14 天，每 2 天换一次培养液。电镜观察如前述。将感染了病毒的细胞收集后，用 2% 的甲醛固定，2% 醋酸双氧铀 (Uranyl Acetate) 负染，直接用电子显微镜观察。RT-PCR 检测如前述 (使用德国 Artus-Biotech 提供的试剂盒，操作方法见该公司提供的使用说明书)。

实验结果：实验结果如下表 (病毒滴度平均值) 所示，制剂在不同的浓度下有降低病毒滴度的显著作用，病毒滴度在第 5 日开始下降，9 日时病毒分离为阴性，对照组病毒分离一直为阳性。电镜和 RT-PCR 测定结果也证明了这一实验结果。

| 时间 (日) 组别 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 100ng | 4.21 | 3.91 | 3.48 | 0.90 | 0.34 | 0.10 | 0.10 | 0.20 | 0.20 |
| 200ng | 4.36 | 4.33 | 3.21 | 0.91 | 0.28 | 0.12 | 0.10 | 0.15 | 0.15 |
| 400ng | 3.98 | 3.21 | 3.83 | 1.00 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| 800ng | 3.76 | 4.12 | 3.33 | 0.80 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0 | 0 |
| 1200ng | 4.10 | 3.38 | 3.41 | 0.60 | 0.30 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 对照 | 4.01 | 3.90 | 3.30 | 3.12 | 2.11 | 2.83 | 2.05 | 2.65 | 2.20 |

实施例 2

短链 DNA 的合成：用 ABI3900 型 DNA 合成仪 (Applied Biosystems Inc. 产品) 合成互补的两条短链 DNA，或合成一条 DNA，但其前后序列中含有互补的序列 (如附图 1 所示)。合成的 DNA 短链如下表所示

| 合成的互补的两条短链 DNA | 前后序列中含有互补的序列的 DNA |
|---|---|
| RdRP003 和 RdRp033, RdRP007 和 RdRp037 RdRP012 和 RdRp042, RdRP022 和 RdRp052 RdRP31 和 RdRp061, RdRP018 和 RdRp048 | SARSTOP101, SARSTOP102, SARSTOP201, SARSTOP302, SARSTOP301, |

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| RdRP028 和 RdRp058, RdRP005 和 RdRp035 | SARSTOP501, SARSTOP402, SARSTOP504 |
|--------------------------------------|---------------------------------------|

互补短链 DNA 的制备：将合成的 2 条互补 DNA 短链溶解于萨斯耐滴鼻液辅剂中，混合后在摄氏 90 度保温 5 分钟，退火至室温，即形成互补短链 DNA。前后序列中含有互补序列的短链 DNA 也同样处理。

短链 DNA 的组合：将合成的互补短链 DNA 或含有互补序列的短链 DNA 按 4 个一组组合成 6 组（如下表所述）。每个短链 DNA 在培养基中的量为 200ng，总量为 800ng。

| 组别 | 组分 |
|----|---|
| A | RdRP003 和 RdRp033, RdRP007 和 RdRp037, RdRP012 和 RdRp042, RdRP022 和 RdRp052 |
| B | RdRP31 和 RdRp061, RdRP018 和 RdRp048, RdRP028 和 RdRp058, RdRP005 和 RdRp035 |
| C | SARSTOP101, SARSTOP102, SARSTOP201, SARSTOP504 |
| D | SARSTOP302, SARSTOP301, SARSTOP501, SARSTOP402 |
| E | RdRP003 和 RdRp033, RdRP007 和 RdRp037, SARSTOP402, SARSTOP504 |
| F | RdRP31 和 RdRp061, RdRP018 和 RdRp048, SARSTOP102, SARSTOP201 |

Vero E6 细胞培养如前述。

病毒培养如前述。取感染细胞的培养液，离心 200rpm，10min，取上清液 200ul，以 50 倍做系列稀释，各相当于滴度为 5、25、125、625、3125 和 15625 TCID₅₀ / ml（Tissue Culture Infective Dose）加入 24 孔培养板，每孔加培养液至 1ml，再加入 1X10⁴ / ml Vero E6 细胞悬液 0.5ml（含有 RNA 或 DNA 制剂），在 37℃，5%CO₂ 条件下培养，24 小时后加入用 20μl 萨斯耐滴鼻液辅剂配置的短链 DNA 组合制剂，对照加入 20μl 萨斯耐辅剂。定期观察细胞病变（Cytopathic Effect, CPE）。继续培养 12 天，每 2 天换一次培养液。培养液中 DNA 制剂量为 800ng。

电镜观察如前述。将感染了病毒的细胞收集后，用 2% 的戊二醛固定，2% 磷钨酸

（Phosphotungstic Acid）负染，直接用电子显微镜观察。RT-PCR 检测如前述（使用德国 Artus-Biotech 提供的试剂盒，操作方法见该公司提供的使用说明书）。

实验结果：实验结果如下表（病毒滴度平均值）所示，制剂在相同的浓度下有降低病毒滴度的作用，病毒滴度在第6日开始下降，10日时病毒分离为阴性，对照组病毒分离一直为阳性。同时实验结果也表明，不同组合的制剂对病毒滴度的影响也是有差异的。

| 组别 时间（日） | A | B | C | D | E | F | 对照 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 3 | 3.21 | 3.11 | 3.25 | 3.78 | 3.53 | 3.41 | 3.01 |
| 6 | 1.31 | 1.51 | 1.98 | 1.01 | 0.93 | 0.89 | 2.53 |
| 10 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 1.90 |
| 12 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 1.68 |

实施例 3

SARS 冠状病毒的培养和 RNA 分离：

培养所用细胞株 Vero E6 接种于含有 10%牛血清的 Eagle's 培养基(2 mM L-glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5g/L sodium bicarbonate), 在 37°C 5%的二氧化碳培养箱中培养，每 2 天换一次培养液。当细胞密度达到 1×10^4 /毫升时，接种 SARS 冠状病毒。继续培养大约 14 天，每 2 天换一次培养液。定期观察细胞病变 (Cytopathic Effect, CPE)。

电镜观察如前述。将感染了病毒的细胞收集后，用 2%的甲醛固定，2%醋酸双氧铀(Uranyl Acetate)负染，直接用电子显微镜观察。RT-PCR 检测如前述（使用德国 Artus-Biotech 提供的试剂盒，操作方法见该公司提供的使用说明书）。结果都呈阳性反应。

取 10 毫升被病毒感染的 Vero E6 细胞 (10^6 cells/mL) 离心沉淀细胞，用 1 ml 培养液洗涤后将细胞重悬浮于 0.2 mL，加入 1 mL TRIZOL Reagent (Life Technology) 在 15-30°C 保温 5-10 分钟，再加入 0.2 mL 氯仿轻柔振摇 15 秒钟，然后在 15-30°C 保温 2-5 分钟，在 2-8°C 12,000 x g 离心 15 分钟，取上清液并移入一个新的 1.5 mL 离心管中，加入 0.5 mL 异丙醇在 15-30°C 保温 5-10 分钟，在 2-8°C 12,000 x g 离心 5-10 分钟，弃上清液，沉淀用 1 mL 75% 乙醇洗涤，在 2-8°C 7,500 x g 离心 5 分钟，弃上清液，沉淀干燥 10-15 分钟，加入无 Rnase 的水在 55-60°C 保温 10-30 分钟，使 RNA 充分溶解。

cDNA 的合成：在小试管中加入总 RNA 0.1-5 µg, oligo(dT)₁₈ 5 µg, 去离子水 (nuclease free) 至 110 µl, 70°C 水浴保温 5 分钟，冰浴冷却，以序加 5 X 反应试剂 40 µl, 10mM 4 dNTP 20 µl (1.0mM 终浓度), RNase 抑制剂 200u, 去离子水(nuclease free)至 190 µl, 在 37°C 保温 5 分钟，

加入 400 单位的反转录酶，在 37°C 保温 60 分钟，70°C 保温 10 分钟，冰浴保存，此为初反应物。

在灭菌的 0.5ml 离心管中依次加入：45 μ l 初反应物；20 μ l 10 \times 缓冲液，8 μ l dNTP 混合物，114 μ l 蒸馏水，2 μ l RNA 酶 H(1.5 U/ μ l)，11 μ l 脱氧核糖核酸(DNA)聚合酶 I(9.0 U/ μ l)，混匀后 16°C 孵育 2.5 h。反应结束后加入 23 μ l dNTP 混合物和 2 μ l Pfu DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ l)，72°C 孵育 30 min，以补平 cDNA 末端。反应结束后采用酚：氯仿(1：1)抽提和乙醇沉淀的方法，得到 cDNA 沉淀，再重悬浮于 TE 缓冲液中，按 10 μ l/管 分装，-20°C 保存。

制备 DNA 模板：采用热启动 PCR(Hot Start PCR)。共制备 5 个不同的 DNA 模板，所使用的正向引物和反向引物的组合为：RdRP006 和 RdRp036，S001 和 S008，M001 和 M003，E001 和 E002，UPA001 和 UPA004（它们的序列如上所述）。PCR 反应混合液（100 μ l）包括：5 μ l cDNA（5 ng/ μ l），10 μ l 10 倍浓度的 PCR 反应缓冲液，正向引物（25 pmol/ μ l）4 μ l，反向引物（25 pmol/ μ l）4 μ l，dNTPs（dTTP, dATP, dGTP, dCTP, 各 2.5 mM）8 μ l，Tag 多聚酶 0.5 μ l（2 单位），加水至 100 μ l。PCR 反应条件：①94 °C 变性 2 分钟，②94 °C 1 分钟，③50 °C 30 秒，④72 °C 5 分钟，⑤重复②——④40 次，⑥72 °C 10 分钟。

DNA 提取：PCR 反应结束后采用酚：氯仿(1：1)抽提和乙醇沉淀的方法提取 DNA，再重悬浮于 TE 缓冲液中，按 10 μ l/管 分装，-20°C 保存。所得 DNA 用常规电泳方法检测，并用 DNA 测序的方法证实这些 DNA 的确是属于我们所感兴趣的 DNA 片段。

双链 dsRNA 的制备：小试管中加入下列反应液：5 倍反应缓冲液 20 μ l，PCR 合成的 DNA 30 μ l，NTPs（TTP, ATP, GTP, CTP, 各 2.5 mM）20 μ l，T7 多聚酶 40 单位（Stratagene 产品），加水至 100 μ l。上述试剂混合好后，在 37°C 保温 4 小时或过夜，反应结束后采用酚：氯仿(1：1)抽提和乙醇沉淀的方法提取 RNA，再重悬浮于萨斯耐喷口液辅剂中，然后将这 5 种双链 dsRNA 按同等比例混合备用。

双链 dsRNA 制剂混合液在不同浓度下的对 SARS 冠状病毒的作用：

Vero E6 细胞培养如前述。细胞接种于含有 10%牛血清的 Eagle's 培养基(2 mM L-glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5g/L sodium bicarbonate), 在 37°C 5% 的二氧化碳培养箱中培养, 每 2 天换一次培养液。当细胞密度达到 1×10^4 /毫升时, 加入用萨斯耐喷口液辅剂配置的双链 dsRNA 制剂混合液(培养液中制剂的加入量分别为 100ng, 200ng, 400ng, 800ng, 1.2 μ g), 对照加入萨斯耐喷口液辅剂, 24 小时后接种 SARS 冠状病毒。病毒培养如前述。取感染细胞的培养液, 离心 200rpm, 10min, 取上清液 200ul, 以 50 倍做系列稀释, 各相当于滴度为 5、25、125、625、3125 和 15625 TCID₅₀ / ml (Tissue Culture Infective Dose) 加入 24 孔培养板, 每孔加培养液至 1ml, 再加入 1×10^4 / ml Vero E6 细胞悬液 0.5ml (含有 RNA 制剂), 在 37°C, 5% CO₂ 条件下培养, 定期观察细胞病变 (Cytopathic Effect, CPE)。继续培养大约 14 天, 每 2 天换一次培养液。电镜观察如前述。将感染了病毒的细胞收集后, 用 2% 的甲醛固定, 2% 醋酸双氧铀 (Uranyl Acetate) 负染, 直接用电子显微镜观察。RT-PCR 检测如前述 (使用德国 Artus-Biotech 提供的试剂盒, 操作方法见该公司提供的使用说明书)。

实验结果: 如下表 (病毒滴度平均值) 所示, 双链 dsRNA 制剂混合液在不同的浓度下有降低病毒滴度的显著作用, 病毒滴度在第 4 日开始下降, 10 日时病毒分离为阴性, 对照组病毒分离一直为阳性。电镜和 RT-PCR 测定结果也证明了这一实验结果。

| 时间 (日) \ 制剂量 | 100ng | 200ng | 400ng | 800ng | 1200ng | 对照 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|--------|------|
| 2 | 3.01 | 3.20 | 2.98 | 2.93 | 3.15 | 3.30 |
| 4 | 1.92 | 1.94 | 1.67 | 1.52 | 1.01 | 2.92 |
| 8 | 0.20 | 0.21 | 0.14 | 0.1 | 0 | 2.45 |
| 10 | 0.20 | 0.10 | 0.10 | 0 | 0 | 2.67 |

实施例 4

短链 DNA 的合成:

用 ABI3900 型 DNA 合成仪 (Applied Biosystems Inc. 产品) 合成互补的两条短链 DNA, 或合成一条 DNA, 但其前后序列中含有互补的序列 (如附图 1 所示)。合成的 DNA 短链为 SARSTOP101, SARSTOP202, RdRp029 和 RdRp059。将合成的 2 条互补 DNA 短链溶解于萨

斯耐喷鼻液辅剂中，混合后在摄氏 90 度保温 5 分钟，退火至室温，即形成互补短链 DNA。前后序列中含有互补序列的短链 DNA 也同样处理。

制备 DNA 模板：

采用热启动 PCR(Hot Start PCR)。共制备 2 个不同的 DNA 模板，所使用的正向引物和反向引物的组合为：UPC001 和 UPD002，N001 和 N004（它们的序列如上所述）。PCR 反应混合液（100 μ l）包括：5 μ l cDNA（5 ng/ μ l），10 μ l 10 倍浓度的 PCR 反应缓冲液，正向引物（25 pmol/ μ l）4 μ l，反向引物（25 pmol/ μ l）4 μ l，dNTPs（dNTP, dATP, dGTP, dCTP, 各 2.5 mM）8 μ l，Tag 多聚酶 0.5 μ l（2 单位），加水至 100 μ l。PCR 反应条件：①94 $^{\circ}$ C 变性 2 分钟，②94 $^{\circ}$ C 1 分钟，③53 $^{\circ}$ C 30 秒，④72 $^{\circ}$ C 5 分钟，⑤重复②—④36 次，⑥72 $^{\circ}$ C 10 分钟。DNA 提取：PCR 反应结束后采用酚：氯仿（1：1）抽提和乙醇沉淀的方法提取 DNA，再重悬浮于 TE 缓冲液中，按 10 再重悬浮于 TE 缓冲液中，按 10 再重悬浮于 TE 缓冲液中，按 10 μ l/管分装，-20 $^{\circ}$ C 保存。所得 DNA 用常规电泳方法检测，并用 DNA 测序的方法证实这些 DNA 的确是属于我们所感兴趣的 DNA 片段。

双链 dsRNA 的制备：

小试管中加入下列反应液：5 倍反应缓冲液 20 μ l，PCR 合成的 DNA 30 μ l，NTPs（TTP, ATP, GTP, CTP, 各 2.5 mM）20 μ l，T7 多聚酶 40 单位（Stratagene 产品），加水至 100 μ l。上述试剂混合好后，在 37 $^{\circ}$ C 保温 4 小时或过夜，反应结束后采用酚：氯仿（1：1）抽提和乙醇沉淀的方法提取 RNA，再重悬浮于萨斯耐喷鼻液辅剂中。

然后将这 2 种双链 dsRNA 和上述 3 种合成的 DNA 短链（SARSTOP101, SARSTOP202, RdRP029 和 RdRp059）按同等比例混合备用。

制剂混合液在不同浓度下的对 SARS 冠状病毒的作用：

Vero E6 细胞培养如前述。细胞接种于含有 10% 牛血清的 Eagle's 培养基（2 mM L-glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5g/L sodium bicarbonate），在 37 $^{\circ}$ C 5% 的二氧化碳培养箱中培养，每 2 天换一次培养液。当细胞密度达到 1×10^4 /毫升时，加入用萨斯耐喷鼻液辅剂配置的制剂混合液（培养液中制剂的加入量分别为 100ng, 200ng, 400ng, 800ng, 1.2 μ g），对照加入萨斯耐喷鼻液辅剂，24 小时后接种 SARS 冠状病毒。病毒培养如前述。取感染细胞的培养液，离心 200rpm, 10min，取上清液 200ul，以 50 倍做系列稀释，各相当于滴

度为 5、25、125、625、3125 和 15625 TCID₅₀ / ml (Tissue Culture Infective Dose) 加入 24 孔培养板, 每孔加培养液至 1ml, 再加入 1×10^4 / ml Vero E6 细胞悬液 0.5ml (含有 RNA 制剂), 在 37°C, 5%CO₂ 条件下培养, 定期观察细胞病变 (Cytopathic Effect, CPE)。继续培养大约 14 天, 每 2 天换一次培养液。电镜观察如前述。将感染了病毒的细胞收集后, 用 2% 的甲醛固定, 2% 醋酸双氧铀 (Uranyl Acetate) 负染, 直接用电子显微镜观察。RT-PCR 检测如前述 (使用德国 Artus-Biosch 提供的试剂盒, 操作方法见该公司提供的使用说明书)。

实验结果, 实验结果表明, 该制剂混合液在不同的浓度下有降低病毒滴度的显著作用。以 400ng 浓度的制剂实验结果为例, 如下表 (病毒滴度平均值) 所示, 病毒滴度在第 3 日开始下降, 10 日时病毒分离为阴性, 对照组病毒分离一直为阳性。

| 组别 \ 时间 (日) | 2 | 3 | 7 | 10 |
|-------------|------|------|------|------|
| 400ng | 3.93 | 1.23 | 0.33 | 0 |
| 对照 | 3.86 | 3.12 | 3.01 | 3.11 |

结论

- A. 本发明中利用 RNA 干扰的原理设计和制备的 RNA 干扰制剂, 包括 dsDNA, dsRNA, siDNA 和 siRNA 经实验证明可分别, 或者同时实现对 SARS 病原体冠状病毒 RNA 复制, 及冠状病毒有关蛋白质合成进行抑制的两种功能。
- B. 本发明中所用于配制 RNA 干扰制剂的辅剂成分, 经实验证明对 SARS 病原体冠状病毒 RNA 复制, 及冠状病毒有关蛋白质合成没有抑制的作用。
- C. 本发明提供的严重急性呼吸道综合症病原体冠状病毒病 RNA 干扰制剂, 在严重急性呼吸道综合症病原体冠状病毒的诊断, 严重急性呼吸道综合症的预防和治疗等方面具有广泛的应用前景。

序 列 表

<110> 天津环球中加生物科技有限公司

<120> 严重急性呼吸道综合症病原冠状病毒 RNA 干扰制剂

<160> 116

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 57

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 1

tctaaacgaa ctttaaaatc tgtgttcaag agacacagat tttaaagttc gtttaga 57

<210> 2

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 2

taaacgaact ttaaaatctg ttcaaggag aacagatttt aaagttcggt ta 52

<210> 3

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 3

acaaagtgtt taatgaaaag ttcaaggag aacttttcat taagaacttt gt 52

<210> 4

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 4

taactaaata cacaatggct gttcaaggag acagccattg tgtatttagt ta 52

<210> 5

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 5

taaataaacg aacaaattaa attcaaggag atttaattg ttcgtttatt ta 52

<210> 6

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 6

taatggacc caatcaaacc attcaaggag atggtttgat tgggggccat ta 52

<210> 7

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 7

attcaactga caataaccag attcaaggag atctggttat tgcagttga at 52

<210> 8

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 8

attacatttg gtggaccac attcaaggag atgtgggtcc accaaatga at 52

<210> 9

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 9

cttgtaaaca actaaacgaa ctcaaggag agtgcgtta gttgtaaaca ag 52

<210> 10

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 10

ttattttctt attatttctt attcaaggag ataagaaata ataagaaaat aa 52

<210> 11

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 11

tctggtctaa acgaactaac ttcaaggag aagttagttc gtttagacca ga 52

<210> 12

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 12
ttttgtaca taataaagct ttccaaggag aaagctttat tatgtacaaa aa 52

<210> 13

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 13
acattacaca taaacgaact ttccaaggag aaagttcgtt tatgtgtaat gt 52

<210> 14

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 14
atttgttat gagattttt attcaaggag ataaaaaatc tcataaaca at 52

<210> 15

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 15
ttggaaacta taaattaaat attcaaggag atatttaatt tatagtttcc aa 52

<210> 16

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 16
atgtttcatc ttgttgactt ctccaaggag agaagtcaac aagatgaaac at 52

<210> 17

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 17

ttagattatc cataaaacga attcaaggag attcgtttta tggataatct aa 52

<210> 18

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 18

atgaaaatta tictcttctt gttcaaggag acaggaagag aataatttct at 52

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 19

ctacccagga aaagccaacc a 21

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 20

cttaggtgac gagcttggca c 21

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 21

attggacctg agcatagtgt t

21

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 22

agtgggtgc taatctttg g

21

<210> 23

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 23

tgagcttgat gaacgtgtg a

21

<210> 24

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 24

ggagggtctt gtttgccttc t

21

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 25

gctaagactg ctcttaagaa a

21

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 26

tggacaacac taatctccac a

21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 27

gtctgcacca cctgctgagt a

21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 28

tgtgaaagtc aacaaccac c

21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 29

ctaacgttac tactatggat t

21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 30

ggctgggtcaa aagacctatg a

21

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 31

agactaactt gtgctacaac t

21

<210> 32

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 32

gagtagtaac aacttttgat g

21

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

| | |
|-------------------------------------|----|
| <400> 33 tcttgctcta tataacaagt a | 21 |
| <210> 34 | |
| <211> 21 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 34 gaaggtaa tctatgggcc a | 21 |
| <210> 35 | |
| <211> 21 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 35 tgtctggta taggcttaag g | 21 |
| <210> 36 | |
| <211> 21 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 36 tttcgagaag atggtttctc t | 21 |
| <210> 37 | |
| <211> 21 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 37 aataatgaac tgagtcagc a | 21 |

<210> 38

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 38

gaatgtggaa aggttatggc t

21

<210> 39

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 39

tggtacgatt tcggtgattt c

21

<210> 40

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 40

ctatcagtga ttatgactat t

21

<210> 41

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 41

cggtgatgct acaactgctt a

21

<210> 42

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 42

tgggaacctg agttttatga g

21

<210> 43

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 43

acaagttgaa tggtggtgat t

21

<210> 44

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 44

cactgtgagt gcttagttt a

21

<210> 45

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 45

gttcgtgcgt ggattggctt t

21

<210> 46

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 46

ttgtgaagtc tgcattgctt g

21

<210> 47

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 47

acctgtttcc atcattaata a

21

<210> 48

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 48

aagcgctcac aagattcacc a

21

<210> 49

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 49

atgactctaa agaagggttt t

21

<210> 50

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

| | |
|-------------------------------------|----|
| <400> 50 cagtgccaag ctcgtcacct a | 21 |
| <210> 51 | |
| <211> 21 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 51 gcaacactat gctgaggtcc a | 21 |
| <210> 52 | |
| <211> 20 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 52 gccc aaaaga ttagacaacc | 20 |
| <210> 53 | |
| <211> 20 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 53 tgtaacacgt tcatcaagct | 20 |
| <210> 54 | |
| <211> 21 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 54 ccagaaagca aacaagaccc t | 21 |

<210> 55

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 55

catttcttaa gagcagtctt a

21

<210> 56

<211> 20

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 56

tgtgtggaga ttatgttgc

20

<210> 57

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 57

tatactcagc aggtggtgca g

21

<210> 58

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 58

gaggtgggtt gttgacttic a

21

<210> 59

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 59

gaaatccata gtagtaacgt t

21

<210> 60

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 60

tctgataggt ctttgacca g

21

<210> 61

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 61

ctagttgtag cacaagttag t

21

<210> 62

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 62

agcatcaaaa gttgttacta c

21

<210> 63

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 63

tgtacttggt atatagagca a

21

<210> 64

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 64

aatggaccat agaatttacc t

21

<210> 65

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 65

atccttaagc ctataaccag a

21

<210> 66

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 66

aaagagaaac catcttctcg a

21

<210> 67

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 67

gctactggac tcagtcatt a

21

<210> 68

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 68

agagccataa ccttccaca t

21

<210> 69

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 69

acgaaatcac cgaaatcgta c

21

<210> 70

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 70

ataatagtca taatcactga t

21

<210> 71

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 71
cataagcagt thtagatca c 21

<210> 72

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 72
ttctaagtga ttgtaaatac a 21

<210> 73

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 73
gtaatcacca acattcaact t 21

<210> 74

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 74
cataaactaa agcactcaca g 21

<210> 75

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 75
tcaaagccaa tccacgcacg a 21

<210> 76
<211> 21
<212> RNA
<213> 冠状病毒(SARS)
<400> 76
agtaagcaat gcagacttca c 21

<210> 77
<211> 21
<212> RNA
<213> 冠状病毒(SARS)
<400> 77
cattcttaat gatggaaaca g 21

<210> 78
<211> 21
<212> RNA
<213> 冠状病毒(SARS)
<400> 78
agtggatgaat ctgtgagcg c 21

<210> 79
<211> 21
<212> RNA
<213> 冠状病毒(SARS)
<400> 79
gaaaaaccct tcttagagt c 21

<210> 80

<211> 20

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 80

gcaccggtca aggtcacttc

20

<210> 81

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 81

acgaacaaat taaaatgtct g

21

<210> 82

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 82

acagattgaa ccagcttgag a

21

<210> 83

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 83

agtggagctt ctgctgattc a

21

<210> 84

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 84

gttggtgtg gcgttacca g

21

<210> 85

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 85

tgaatcagca gaagctccac t

21

<210> 86

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 86

tttgcatc tcctaagaag c

21

<210> 87

<211> 20

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 87

attattctt actctcactg

20

<210> 88

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 88
tacagccttt tcacctgctc a 21

<210> 89

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 89
ttaattgtta ttggccatta a 21

<210> 90

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 90
tacagaagta atgcctgttt c 21

<210> 91

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 91
acacacttgt taaacaactt a 21

<210> 92

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 92
aatgaggtcg ctaaaaattt a 21

| | |
|--------------------------------------|----|
| <210> 93 | |
| <211> 21 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 93 ctgacgtgcc ccaaattgtct t | 21 |
| <210> 94 | |
| <211> 21 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 94 ccataatcat ttaatggcca a | 21 |
| <210> 95 | |
| <211> 21 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 95 atattacaat ctacggaggt t | 21 |
| <210> 96 | |
| <211> 21 | |
| <212> RNA | |
| <213> 冠状病毒(SARS) | |
| <400> 96 gcacacttga aattgcacca a | 21 |
| <210> 97 | |

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 97

catattttcc caattctga a

21

<210> 98

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 98

agagtaaaaa atctcataaa c

21

<210> 99

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 99

ttattctgtt tggaacttta a

21

<210> 100

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 100

attgtgacca gaccgctcat g

21

<210> 101

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 101

gatcacagca ccaatgacaa g

21

<210> 102

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 102

atatctctgc tattgtaacc t

21

<210> 103

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 103

gtttatgaga ttttttactc t

21

<210> 104

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 104

ctaccaaatt ggtggttatt c

21

<210> 105

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 105

caaatccaag aacccattac t

21

<210> 106

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 106

tgatgagccg acgacgacta c

21

<210> 107

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 107

gttgacttcc aggttacaat a

21

<210> 108

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 108

aaaattattc tcttctgac a

21

<210> 109

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 109
gtaccttcac gaaggtcacc a 21

<210> 110

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 110
tagtctttaa cacctgagtg c 21

<210> 111

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 111
tttaagctcc tcaacggtaa t 21

<210> 112

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 112
ggatggctag tgtgactagc a 21

<210> 113

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 113
gtctgccatg ataagcaatg t 21

<210> 114

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 114

caagatgtaa atacaatcaa t

21

<210> 115

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 115

aggaatagca gaaaggctaa a

21

<210> 116

<211> 21

<212> RNA

<213> 冠状病毒(SARS)

<400> 116

ttctgggcca gttcctaggt a

21

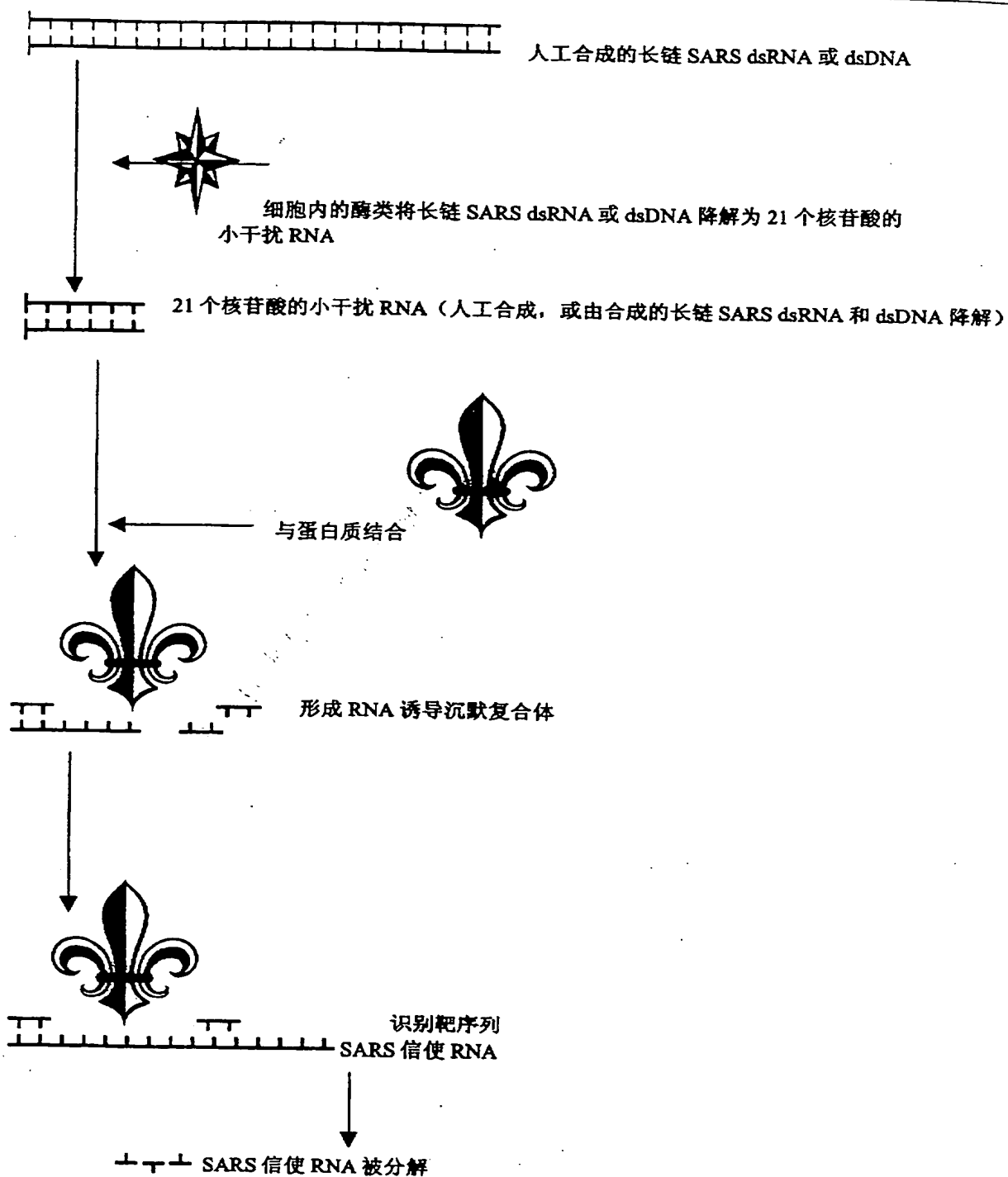


图 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5'-TCTAAACGAACTTTAAAATCTGTG-3'
| | | | | | | | | |
3'-AGATTGCTTGAAATTTAGACAC-5'

5'-TCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTTCA—
| | | | | | | | | |
3'-AGATTGCTTGAAATTTAGACACAGAGA—

5' TCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTTCAAGAGACACAGATTTTAAAGTTCGTTTAGA 3'

图 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)